

BIODIESEL DARI MIKROALGA: PERBANYAKAN BIOMASSA MELALUI PENAMBAHAN NUTRISI SECARA BERTAHAP

Astuti, J T., dan Sriwuryandari, L.

Bidang Fisika Industri dan Lingkungan, Pusat Penelitian Fisika-LIPI
Jalan Cisitua Sangkuriang Bandung 40135
E-mail: jtri001@lipi.go.id

ABSTRAK

Pemanfaatan sinar matahari dan CO₂ pada fotosintesis oleh mikroalga adalah satu teknologi untuk memperoleh energi alternatif yang dapat diperbaharui. Energi tersebut tersimpan dalam biomassa sel dan dapat diubah menjadi biodiesel. Pertumbuhan dan komposisi sel mikroalga dipengaruhi oleh strain dan kondisi lingkungan, termasuk suhu dan nutrisi. Tujuan penelitian adalah untuk optimasi produksi biomassa *Nannochloropsis* sp melalui penambahan nutrisi secara bertahap. Penelitian menggunakan erlenmeyer berisi 400 ml media f/2. NaHCO₃ digunakan sebagai sumber C, sedangkan NH₄NO₃ dan KH₂PO₄ sebagai sumber N dan P ditambahkan bervariasi, yaitu sesuai rumus empiris sel mikroalga (N₀P₀); N berlebih 10% (N₁₀P₀); P berlebih 10% (N₀P₁₀); dan N-P berlebih 10% (N₁₀P₁₀). Penambahan dalam tiga tahap. Biomassa dipanen pada hari ke 35 dan pengamatan meliputi suhu, pH, optical density (OD), berat kering sel (BKS), kadar klorofil-a dan lipid. Suhu media berkisar 24,0-33,5°C dan pH stabil antara 9,0-9,5. OD meningkat tajam dari 0,213-0,266 ke 1,74-2,31. Kadar klorofil-a berkisar 78,44-95,11 mg.L⁻¹. Produksi biomassa kering cukup tinggi, yaitu antara 1,61-2,73 g.L⁻¹ dan kadar lipid antara 15,26-34,37% BKS. Nilai terbaik diperoleh dari perlakuan N₁₀P₀ dengan produksi biomassa 2,73 g.L⁻¹ dan kadar lipid 34,37% BKS. Dapat disimpulkan penambahan nutrisi C, N, P secara bertahap dapat meningkatkan produksi biomassa. Asam lemak *Nannochloropsis* didominasi oleh asam palmitat, laurat, dan miristat.

Kata kunci: biodiesel, lipid, mikroalga, *Nannochloropsis* sp, nutrisi.

BIODIESEL OF MICROALGAE: BIOMASS MULTIPLICATION BY GRADUALLY ADDITION OF NUTRITION

ABSTRACT

Sunlight and CO₂ utilization in photosynthesis by microalgae is a technology for getting a renewable energy. This energy is stored within cell and can be converted to biodiesel. Growth and composition of microalgae is influenced by strain and environment, including temperature and nutrition. This study was aimed to optimize the biomass production of microalgae *Nannochloropsis* sp by gradually addition of nutrition. NaHCO₃ was used as Carbon source. NH₄NO₃ and KH₂PO₄ as Nitrogen and Phosphor source was added in different concentration, i.e. normal concentration, based on molecule structure of microalgae cell (N₀P₀); excess 10% of N (N₁₀P₀); excess 10% of P (N₀P₁₀); and excess 10% of both (N₁₀P₁₀). Adding of N and P was in three steps, i.e. 40; 30; and 30% of total requirement, which was carried out at 0; 15th; and 25th days, respectively. Culture was cultivation at natural condition and harvested at 35th days. Analysis was covering of temperature, pH, optical density (OD), Dry Cell Weight, chlorophyll-a, lipid, and fatty acids. Data showed the medium temperature was 24,0-33,5°C, pH stable at 9,0-9,5. OD increased significantly from 0,213-0,266 to 1,74-2,31. Chlorophyll-a was 78.44-95,11 mg.L⁻¹. Production of DCW was high, i.e. 1,61-2,73 g.L⁻¹ and lipid 15,26-34,37% DCW. The best result was obtained from N₁₀P₀ treatment that produced 2.73 g.L⁻¹ DCW and lipid 34,37% DCW. Fatty acid of *Nannochloropsis* was dominated by saturated fatty acids, i.e. palmitic, lauric, and myristic acids. Gradually addition of C, N, and P in three steps could increase biomass production significantly.

Key word: Biodiesel, lipid, microalgae, *nannochloropsis* sp. nutrition.

PENDAHULUAN

Wacana untuk mencari sumber energi alternatif berupa bahan bakar nabati (BBN) sebagai respon terhadap krisis bahan bakar minyak bumi telah berkembang pesat pada dua dekade terakhir, antara lain dengan melakukan kultivasi mikroalga. Mikroalga adalah mikroorganisme uniselular atau multiselular sederhana yang mampu mengikat CO_2 dan menyerap energi matahari dengan sangat efisien untuk menghasilkan energi melalui proses fotosintesa (Christi, 2007; Li *dkk.*, 2008). Energi tersebut tersimpan di dalam sel yang selanjutnya dapat diubah menjadi biodiesel yang bersifat dapat diperbarui, non toksik, dapat diurai secara alami, dan tidak bersulfur (Wagner, 2007).

Kultivasi mikroalga juga berperan penting di dalam sistem CDM (*Clean Development Mechanism*) karena mampu mereduksi CO_x dan NO_x dari emisi gas buangan industri dan asap kendaraan bermotor secara sederhana dan murah (Huntley & Redalje, 2007).

Kultivasi mikroalga potensial untuk dikembangkan di Indonesia karena wilayah perairannya luas (ZEE atau Zona Ekonomi Eksklusif $\pm 2,7$ juta km^2), pantainya panjang (± 81.000 km), dan sinar matahari tersedia di sepanjang tahun.

Dikatakan pertumbuhan dan komposisi mikroalga dipengaruhi oleh strain dan kondisi lingkungan, seperti suhu (Lupi *dkk.*, 1991) dan ketersediaan zat nutrisi (Singh & Kumar, 1992). Karbon (C), nitrogen (N), dan phosphor (P) adalah unsur nutrisi yang diperlukan oleh alga dalam jumlah terbanyak. Strain mikroalga bersifat spesifik. Strain yang berbeda memfiksasi CO_2 dari sumber dan konsentrasi yang berbeda. Kultivasi sederhana dilakukan di dalam sistem tertutup atau kolam terbuka yang diaerasi dengan CO_2 udara. Tetapi, karena kadar CO_2 di atmosfer sangat rendah (0,03–0,06%), pembentukan massa yang terjadipun menjadi terbatas (Huntley & Redalje, 2007).

Kadar C biomassa mikroalga bervariasi tergantung kepada strain, nutrisi, dan kondisi kultivasi. Secara teoritis jumlah molekul CO_2 minimum yang harus difiksasi oleh sel mikroalga dan kebutuhan N dan P dapat dihitung berdasarkan rumus empiris molekul sel mikroalga ($\text{CO}_{0,48}\text{H}_{1,83}\text{N}_{0,11}\text{P}_{0,01}$) dan target produksi yang diinginkan (Christi, 2007). Metabolisme unsur C, N, dan P saling berkaitan satu sama lain (Huppe dan Turpin, 1994), dan pemilihan jenis sumber dan konsentrasi nutrisi harus disesuaikan dengan

karakteristik strain mikroalga agar pertumbuhan optimum (Wang *dkk.*, 2008).

Dilaporkan bahwa sejumlah mikroalga mampu memanfaatkan ion karbonat dalam bentuk Na_2CO_3 dan NaHCO_3 sebagai sumber C. Kebanyakan dari spesies ini mempunyai kisaran pH optimal antara 9–11 (Huertas *dkk.*, 2000). Penelitian lain menunjukkan pertumbuhan alga di dalam medium tanpa N menjadi lambat (Xu *dkk.*, 2001). Diperlukan tambahan N untuk meningkatkan laju pembentukan sel. Sumber N yang lazim digunakan untuk kultivasi mikroalga adalah dalam bentuk nitrat, amonia, urea atau kombinasi diantaranya (Lourenco *dkk.*, 1998). P-fosfat memegang peran sentral di dalam transfer energi sel. Konsentrasi P yang rendah akan berdampak pada keseimbangan proses asimilasi C dan N (Berdall *dkk.*, 1998).

Mikroalga *Eustimatophyta Nannochloropsis* sp dikenal sebagai sumber potensial untuk produksi biodiesel. Kadar lipid mikroalga tersebut berkisar antara 33,3–37,8% (Fabregas *dkk.*, 2004). Namun, pengetahuan tentang pengaruh lingkungan dalam pemanfaatan karbon inorganik pada kelompok mikroalga tersebut masih terbatas. Pada penelitian sebelumnya telah dicoba pemberian C, N, dan P dalam satu tahap, tetapi jumlah biomassa sel yang dihasilkan sangat rendah, yaitu hanya antara 0,3–0,5 g.L⁻¹. Hal ini dapat difahami karena pada fase awal pertumbuhan populasi sel mikroalga relatif masih rendah sehingga kemampuannya untuk memfiksasi ion karbonatpun masih terbatas. Penambahan ion karbonat (CO_3^{2-}) dan fosfat (PO_4^{3-}) pada konsentrasi tinggi di awal masa pertumbuhan justru menyebabkan terjadinya reaksi antara ion karbonat dengan kation Ca^{2+} dan Mg^{2+} yang ada di dalam media membentuk endapan putih.

Dalam penelitian ini, *Nannochloropsis* sp dikultivasi dalam media dengan sumber karbon inorganik yaitu sodium bikarbonat (NaHCO_3) dengan penambahan N dan P bervariasi dan bertahap dengan tujuan agar zat nutrisi tersebut dapat diserap secara lebih efisien sehingga produksi biomassa sel menjadi lebih optimal.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di laboratorium LIPI Bandung (847M dpl, 06°52'57,5" LS, 107°36'39,8" BT) pada suhu dan cahaya alami. Dalam penelitian digunakan mikroalga *Nannochloropsis* sp yang diperoleh dari Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI, dan diperbanyak

dengan media f/2. Sodium bikarbonat (NaHCO_3), ammonium nitrat (NH_4NO_3), dan potassium dihidrogen fosfat (KH_2PO_4) digunakan sebagai sumber C, N, dan P. Mineral dan vitamin tersedia di dalam media f/2 (Tabel 1) dan air laut yang digunakan sebagai media diambil dari Ancol (Tabel 2).

Tabel 1. Komposisi media f/2 (tanpa N dan P)

Bahan	Konsentrasi (M)
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	$1,07 \times 10^{-4}$
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$1,00 \times 10^{-5}$
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$1,00 \times 10^{-5}$
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	$4,00 \times 10^{-8}$
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$3,00 \times 10^{-8}$
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$8,00 \times 10^{-8}$
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$5,00 \times 10^{-8}$
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	$9,00 \times 10^{-7}$
Vitamine B_{12}	$1,00 \times 10^{-10}$
Biotin	$2,00 \times 10^{-9}$
Thiamine-HCl	$3,00 \times 10^{-7}$

Tabel 2. Komposisi air laut Ancol (24 April 2009) yang digunakan dalam penelitian

Parameter	Satuan	Nilai
pH	-	7,93
Natrium (Na^+)	mg.L^{-1}	10,380
Magnesium (Mg^{2+})	mg.L^{-1}	1,118.2
Kalsium (Ca^{2+})	mg.L^{-1}	342
Kalium (K^+)	mg.L^{-1}	382
Klorida (Cl^-)	mg.L^{-1}	17,395
Sulfat (SO_4^{2-})	mg.L^{-1}	2,670
Bikarbonat (HCO_3^-)	mg.L^{-1}	79,1
Bromida (Br^-)	mg.L^{-1}	120
Berat jenis	g.ml^{-1}	1,020

Kebutuhan C mikroalga dihitung secara teoritis menggunakan rumus empiris molekul sel alga, $\text{C}_{1.83} \text{H}_{1.83} \text{O}_{0.48} \text{N}_{0.11} \text{P}_{0.01}$ (Christi, 2007). Untuk perlakuan, delapan Erlenmeyer (Vol. 500 ml) berisi 400 ml medium f/2 (tanpa N, P) disterilkan, lalu ditambah N dan P steril (NH_4NO_3 dan KH_2PO_4) dalam jumlah bervariasi, yaitu sesuai rumus molekul sel alga (N_0P_0) sebagai kontrol; N berlebih 10% (N_{10}P_0); P berlebih 10% (N_0P_{10});

dan N dan P berlebih 10% ($\text{N}_{10}\text{P}_{10}$), dengan empat ulangan. Inokulum ditambahkan 10 ml secara aseptis. Nutrisi ditambahkan dalam tiga tahap, yaitu pada hari ke 0; 15; dan 25 masing-masing 40; 30, dan 30% dari total kebutuhan. Biomasa dipanen pada hari ke 35. Gambar 1 menunjukkan rangkaian kultivasi *Nannochloropsis*.



Gambar 1. A. Menunjukkan rangkaian kultivasi *Nannochloropsis*
B. Kultivasi *Nannochloropsis*. sp dengan penambahan C, N, P bertahap

Pengamatan meliputi suhu, pH, *Optical Density* (OD), Dry Cell Weight atau Berat Kering Sel (BKS), kadar khlorofil-a dan lipid. Suhu diukur dengan thermometer, pH dengan pH-meter (Lutron-206), OD (λ 680 nm) dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 680nm (Liang dkk., 2009). Kadar khlorofil-a ditentukan menggunakan metoda Grabbelaar & Kurano (2003). Sample dilarutkan di dalam acetone dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang (λ) 664 dan 647 nm. Kadar khlorofil-a dihitung menggunakan persamaan 1 dan dinyatakan dalam satuan mg.L^{-1} .

$$\text{Khl-a} = \{(12.64 \times A_{664}) - (2.99 \times A_{647})\} \times 20 \quad \dots\dots\dots (1)$$

Keterangan:

Khl-a = Kadar Khlorofil-a (mg.L^{-1})

A_{664} = Nilai Absorbansi pada = 664 nm

A_{647} = Nilai Absorbansi pada = 647 nm.

BKS ditentukan secara gravimetri (Su dkk., 2008). Sebanyak 2 ml sample dimasukkan ke dalam cuvet dan disentrifusi tiga menit (12000 rpm), lalu biomasanya dicuci dengan 2 ml aquadest, disentrifusi lagi dan dibuang filtratnya (diulang tiga kali). Biomasa dipindahkan ke wadah (diketahui berat keringnya) dan dikeringkan pada $T70^\circ\text{C}$ hingga berat konstan (16 jam). BKS (g.L^{-1}) dihitung menggunakan persamaan 2.

$$\text{BKS} = (W_1 - W_0) \times 1000/V \quad \dots\dots\dots (2)$$

Keterangan:

BKS = Berat Kering Sel (g.L^{-1})

W_1 = Berat kering wadah + biomasa sel

W_0 = Berat kering wadah

V = Volume sample (2 ml).

Lipid mikroalga diekstraksi menggunakan campuran chloroform:methanol:air (2:2:1 v/v). Lipid yang ada di dalam fraksi chloroform dipisahkan dan dikeringkan dalam oven 70°C (Bligh & Dyer, 1959). Kadar lipid (%BKS) dihitung menggunakan persamaan 3.

$$\text{Total Lipid} = (W_1 - W_0)/\text{BKS} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (3)$$

Keterangan:

W_1 = Berat kering wadah + lipid (g)

W_0 = Berat kering wadah (g)

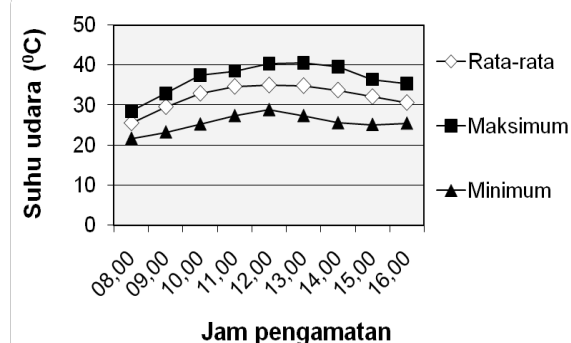
BKS = Berat kering sel dalam 2 ml sample (g).

Untuk analisis komposisi asam lemak dilakukan reaksi trans metil estifikasi terhadap lipid mikroalga menggunakan methanol dan BF_3 . Selanjutnya dianalisis menggunakan Gas Chromatography (GCMS-QP5000) yang dilengkapi dengan Mass Spectrometry Detector dan DB-17 Capillary Column (L 30 m, \varnothing 0.25 mm). Injektor dan detektor dijaga konstan masing-masing pada suhu 250 dan 300°C . Suhu dimulai pada 80°C selama 3 menit, dan meningkat $10^\circ\text{C min}^{-1}$ hingga mencapai 260°C . Kecepatan aliran 1.1 mL min^{-1} , linear velocity 37.5, dan tekanan 67.7 kpa. Jumlah sample yang diinjeksikan sebanyak 1 μL . Identifikasi asam lemak menggunakan *NIST and Wiley Library*. Kadar asam lemak (relatif) dihitung dengan membandingkan luas area setiap komponen asam lemak terhadap total area yang ada di kromatogram GCMS. Kadar asam lemak dinyatakan dalam % total asam lemak.

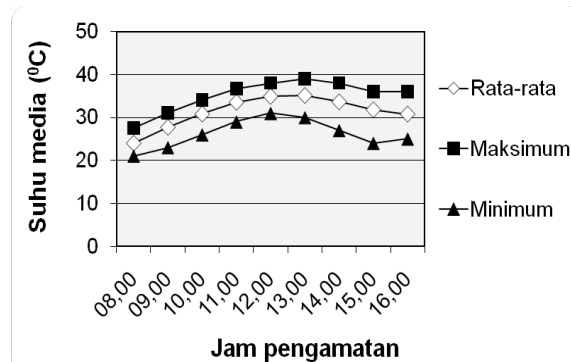
HASIL DAN PEMBAHASAN

Selama periode penelitian, suhu udara ruang kultivasi pada siang hari berfluktuasi pada kisaran antara $21,70\text{--}40,50^\circ\text{C}$ dengan rata-rata $32,19^\circ\text{C}$ (Gambar 2). Sedangkan suhu media kultivasi berkisar antara $21,00\text{--}39,00^\circ\text{C}$ atau rata-rata $31,36^\circ\text{C}$, sedikit lebih rendah dibanding suhu udara luar (gambar 3). Suhu puncak terjadi pada periode antara jam 12.00-14.00 yang mencapai $38,00\text{--}40,50^\circ\text{C}$. Suhu puncak merupakan titik kritis bagi mikroalga, apakah mampu beradaptasi ataukah sebaliknya.

Dikatakan bahwa suhu optimal pertumbuhan *Nannochloropsis* adalah $22\text{--}27^\circ\text{C}$ (Fabregas dkk., 2004). Dari hasil pengamatan suhu dapat disimpulkan bahwa mikroalga *Nannochloropsis* sp mampu beradaptasi dan tumbuh dengan baik pada suhu alami, yaitu antara $21,00\text{--}39,00^\circ\text{C}$ dengan Rh antara 36-88%. Sifat adaptif dari mikroalga *Nannochloropsis* sp terhadap suhu lingkungan tersebut sangat penting untuk mempermudah di dalam implementasinya nanti di lapangan.



Gambar 2. Fluktuasi suhu udara luar pada siang hari selama penelitian.

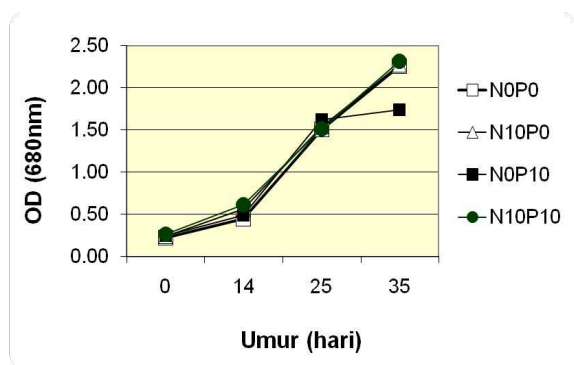


Gambar 3. Fluktuasi suhu media kultivasi pada siang hari selama penelitian.

Dilaporkan mikroalga yang mampu memanfaatkan ion karbonat dalam bentuk Na_2CO_3 maupun NaHCO_3 sebagai sumber C mempunyai kisaran pH optimal antara 9-11 (Huertas dkk., 2000). Dari data yang diperoleh diketahui pH kultur untuk semua tingkat perlakuan menunjukkan pola sama yaitu cenderung stabil pada kisaran 9,0-9,5. Secara kualitatif, kerapatan biomasa sel mikroalga dapat dilihat dari nilai OD (Liang dkk., 2009). Data menunjukkan adanya peningkatan nilai OD secara tajam selama fase pertumbuhan (Gambar 4). Pada hari ke nol nilai OD hanya berkisar antara 0,213-0,266 atau rata-rata 0.245 dan pada hari ke 35 meningkat 8,76 kali lipat, yaitu menjadi 1,745-2,313 atau rata-

rata 2,147. Ketersediaan zant nutrisi di dalam media kultivasi menjadi semakin terjamin dengan cara penambahannya yang bertahap. Akibatnya, pertumbuhan mikroalga semakin baik dan kerapatan biomasa sel semakin meningkat.

Nilai OD dari setiap perlakuan pada hari ke 35 adalah 2,255; 2,276; 1,745; dan 2,313 masing-masing untuk perlakuan N_0P_0 ; $N_{10}P_0$; N_0P_{10} ; dan $N_{10}P_{10}$. Peningkatan nilai OD pada perlakuan N_0P_{10} tampak mulai menurun pada hari ke 25. Hal ini diduga disebabkan oleh ketersediaan unsur P di dalam media terlalu tinggi sehingga pemanfaatan N untuk metabolisme sel justru berkurang.

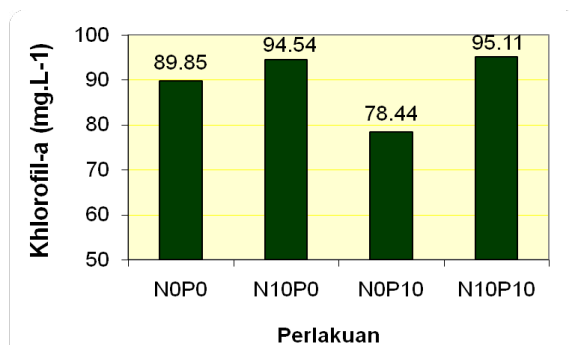


Gambar 4. OD (680nm) media mikroalga *Nannochloropsis* selama pertumbuhan.

Mikroalga merupakan mikroorganisme autotrof yang mampu memanfaatkan langsung CO_2 sebagai sumber C dan menghasilkan energi kimia dalam bentuk biomasa sel melalui proses fotosintesa (Chisti 2007; Li dkk., 2008). Dalam fotosintesa mutlak diperlukan khlorofil. Khlorofil tersebut berada di dalam khloroplas. *Nannochloropsis* memiliki satu khloroplas di setiap selnya dan hanya memproduksi jenis khlorofil-a ($C_{55}H_{72}MgN_4O_3$) dan tidak memproduksi khlorofil-b maupun jenis khlorofil lainnya (Hoek dkk., 2002). Jumlah khlorofil berpengaruh terhadap produksi biomasa dan komposisi sel mikroalga (Su dkk., 2008).

Data menunjukkan kadar khlorofil-a untuk N_0P_0 ; $N_{10}P_0$; N_0P_{10} ; dan $N_{10}P_{10}$ berturut-turut adalah 89,85; 94,54; 78,44; dan 95,11 $mg.L^{-1}$ atau rata-rata 89,48 $mg.L^{-1}$. Jika dibandingkan terhadap produksi biomasa kering sel, maka kadar khlorofil-a tersebut setara dengan 4,86; 4,80; 4,71 dan 3,49% yaitu untuk perlakuan N_0P_0 ; $N_{10}P_0$; N_0P_{10} ; dan $N_{10}P_{10}$ atau rata-rata 4,36% dihitung dari total berat kering sel (Gambar 5). Nilai tersebut lebih tinggi dibanding kadar khlorofil-a *Nannochloropsis oculata* yang berkisar 0,27-0,08% (Su dkk., 2008). Sedangkan

kadar khlorofil-a *Nannochloropsis sp* yang dikultivasi di dalam media f/2 yang diperkaya dengan Mg^{2+} berkisar antara 2.4-2.8% (Tri Astuti dkk., 2010). *Nannochloropsis gaditana* memiliki nilai yang lebih tinggi, yaitu 260,0; 209,2; dan 349.1 $mg.L^{-1}$ pada umur 6; 9; dan 14 hari (Lubian dkk., 2000).



Gambar 5. Kadar khlorofil-a *Nannochloropsis sp* pada konsentrasi N dan P berbeda.

Mengacu pada rumus empiris sel mikroalga adalah $C_{11.83}H_{1.83}O_{0.48}N_{0.11}P_{0.01}$ (Christi, 2007), maka dapat disimpulkan bahwa C merupakan unsur dominan di dalam sel mikroalga yaitu mencapai 51,59%. Sedangkan N dan P hanya sekitar 6,62 dan 1,33%. Tingkat fiksasi C oleh sel mikroalga sangat berpengaruh terhadap produksi biomasa. Penyerapan C inorganik oleh mikroalga dipengaruhi oleh konsentrasi N (Giordano dkk., 2005). Kadar CO_2 yang tinggi akan meningkatkan proses asimilasi N oleh mikroalga (Hu & Xu 2008). Secara umum, C dan N akan terserap dengan cepat dan terakumulasi dalam bentuk biomasa sel jika konsentrasi P rendah (Hu & Zhou, 2010).

Nilai kelarutan CO_2 di dalam air dipengaruhi oleh suhu. Nilai kelarutan CO_2 semakin rendah jika suhu semakin tinggi. Sebaliknya nilai kelarutan $NaHCO_3$ semakin tinggi jika suhu semakin meningkat. Pada Tabel 3 dapat dilihat nilai kelarutan CO_2 di dalam media air pada suhu 30-40°C sangat rendah, yaitu hanya berkisar 0,0973-0,1257 g/100 ml, sedangkan $NaHCO_3$ berkisar 11,1-12,7 g/100 ml (Perry dkk., 1984).

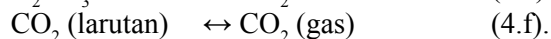
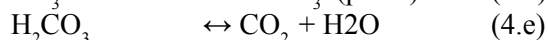
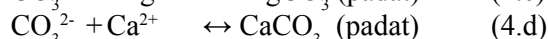
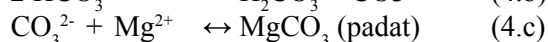
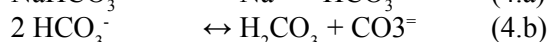
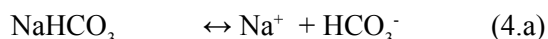
Tabel 3. Kelarutan CO_2 dan $NaHCO_3$ dalam air (g/100ml)

Senyawa \ Suhu ($^{\circ}C$)	20	30	40
CO_2	0,1688	0,1257	0,0973
$NaHCO_3$	9,6000	11,1000	12,7000

Dalam penelitian, NaHCO_3 yang ditambahkan ke dalam media akan terionisasi di melalui beberapa mekanisme reaksi seperti disajikan pada persamaan 4. Perlu dipertimbangkan bahwa ion CO_3^{2-} sangat mudah bereaksi dengan Ca^{2+} dan Mg^{2+} membentuk endapan putih (Cotton & Wilkinson, 1972). Hal ini terjadi jika kadar Ca^{2+} dan Mg^{2+} di dalam media kultivasi tinggi. Pada Tabel 2 dapat dilihat kadar Ca^{2+} dan Mg^{2+} air laut yang digunakan dalam penelitian cukup tinggi, yaitu 342 dan 1.118 mg.L^{-1} .

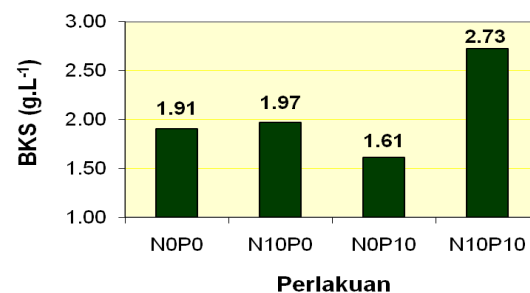
Penambahan C, N, P secara bertahap yang dilakukan di dalam penelitian memungkinkan unsur-unsur tersebut berada dalam kondisi terlarut dan seimbang sehingga dapat langsung dimanfaatkan oleh sel mikroalga untuk pembentukan biomassa. Dengan demikian, hilangnya C dari sistem sebagai akibat dari terjadinya reaksi pembentukan endapan putih CaCO_3 dan MgCO_3 (persamaan 4.c-d) maupun pelepasan gas CO_2 bebas ke atmosfer (persamaan 4.e-f) dapat ditekan.

Persamaan 4:

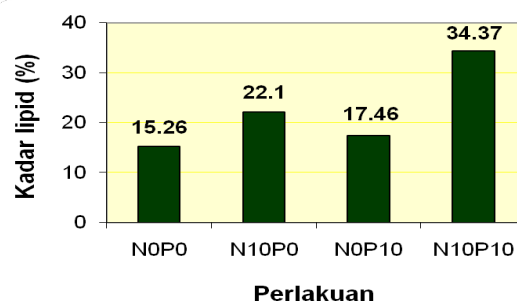


Produksi BKS *Nannochloropsis sp* mencapai 1.91 (N_0P_0); 1.97 (N_{10}P_0); 1.61 (N_0P_{10}); dan 2.73 g.L^{-1} ($\text{N}_{10}\text{P}_{10}$), atau rata-rata 2.05 g.L^{-1} (Gambar 6). Jika dibanding dengan cara penambahan C, N, P yang dilakukan sekaligus pada hari ke nol, penambahan bertahap mampu meningkatkan produksi biomassa 500%. Perlakuan $\text{N}_{10}\text{P}_{10}$ memberikan hasil tertinggi sedangkan N_0P_{10} terendah. Diduga konsentrasi P yang tinggi pada N_0P_{10} justru menghambat pembentukan biomassa sel.

Dikatakan Wang, (2008) bahwa kadar lipid yang tinggi dari mikroalga sangat diperlukan jika tujuan penggunaan mikroalga tersebut adalah sebagai bahan baku biodiesel. Namun kadar lipid yang tinggi dari mikroalga biasanya diperoleh dalam kondisi *stress*, yang secara bersamaan akan terjadi penurunan produksi biomassa sel (Ratledge, 2002). Oleh karena itu, konsentrasi zat nutrisi (C, N, P) di dalam media sebaiknya ditentukan secara tepat agar diperoleh kombinasi optimum antara kedua target yang ingin dicapai, yaitu secara kuantitas produksi biomasanya tinggi dan secara kualitas kadar lipidnya tinggi (Wang dkk., 2008).



Gambar 6. Produksi biomassa *Nannochloropsis* pada konsentrasi N dan P berbeda.



Gambar 7. Kadar lipid *Nannochloropsis sp* pada perlakuan berbeda

Dari hasil analisis diperoleh kadar lipid *Nannochloropsis* berkisar antara 15.26-34.37% atau rata-rata 22.3% dari berat kering sel (Gambar 7). Nilai tertinggi diperoleh dari perlakuan $\text{N}_{10}\text{P}_{10}$ yaitu sebesar 34.37%. Nilai tersebut relatif lebih rendah dibanding hasil penelitian sebelumnya yang dapat mencapai 36.19-46.67% (Tri Astuti dkk., 2008); dan 33.3-37.8% (Fabregas dkk., 2004). Cara penambahan zat nutrisi secara bertahap dilakukan untuk menciptakan kondisi optimum bagi mikroalga untuk memperbanyak biomassa. Sebaliknya, pada kondisi kecukupan nutrisi sel alga cenderung lamban dalam memproduksi lipid seperti dikatakan Ratledge (2002).

Hasil analisis secara kualitatif menggunakan GCMS (Tabel 4) menunjukkan bahwa lipid *Nannochloropsis* terdiri dari asam laurat (C12:0), miristat (C14:0) dan palmitat (C16:0) yang semuanya merupakan kelompok asam lemak jenuh (ikatan rangkap nol). Total asam lemak jenuh tersebut mencapai 73.25%; 75.11%; 84.53%; dan 82.91%, berturut-turut untuk perlakuan N_0P_0 ; N_{10}P_0 ; N_0P_{10} ; dan $\text{N}_{10}\text{P}_{10}$. Hasil fraksinasi komponen asam lemak menunjukkan pola yang sama untuk semua tingkat perlakuan.

Penggunaan dosis N dan atau P yang lebih tinggi cenderung meningkatkan kadar asam miristat. Sedangkan kadar asam laurat

Tabel 4. Komposisi asam lemak *Nannochloropsis* pada berbagai perlakuan (%)

Komposisi asam lemak	Nama Ilmiah	Rumus kimia	Formula Atom C	Perlakuan			
				N ₀ P ₀	N ₁₀ P ₀	N ₀ P ₁₀	N ₁₀ P ₁₀
Laurat	n-Dodecanoat	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	C12:0	16.81	19.88	30.26	8.42
Miristat	Tetradecanoat acid	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	C14:0	7.35	11.00	15.05	16.70
Palmitat	Hexadecanoat	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	C16:0	49.09	44.23	39.22	57.79
Lainnya	-	-	-	26.75	24.89	15.47	17.09

cenderung menurun dan asam palmitat meningkat jika ditambahkan N dan P berlebih 10% (N₁₀P₁₀). Hasil analisis menunjukkan bahwa lipid *Nannochloropsis* didominasi oleh asam palmitat (C16:0) yang mencapai 39.22-57.79%. Hasil serupa dilaporkan Fang dkk (2004) bahwa asam palmitat merupakan asam lemak dominan di dalam lipid *Nannochloropsis sp* walaupun kadar yang diperoleh lebih rendah, yaitu hanya 24.6%. Namun, asam lemak *Nannochloropsis sp* yang diperoleh Fang dkk (2004) lebih beragam, termasuk beberapa asam lemak tidak jenuh seperti asam palmitolat (C16:1n7), oleat (C18:1n9), and EPA (C20:5n5, 8, 11, 14, 17). asam laurat (C12:0); dan miristat (C14:0) masing-masing sebesar; 8.42-30.26; dan 7.35-16.79%. Perbedaan ini diduga disebabkan oleh perbedaan kondisi kultivasi mikroalga dalam penelitian.

SIMPULAN

Karbon dari NaHCO₃ dapat dimanfaatkan untuk metabolisme dan pertumbuhan *Nannochloropsis sp*. Perbanyak biomasa sel mikroalga dapat ditingkatkan melalui penambahan C, N, dan P secara bertahap. Produksi biomasa kering sel cukup tinggi yaitu antara 1.61-2.73 g.L⁻¹ dengan rata-rata 2.053 g.L⁻¹. Kadar lipid berkisar antara 15.26-34.37% dari berat kering sel atau rata-rata 22.3%. Lipid *Nannochloropsis* didominasi oleh asam palmitat. Walaupun kadar lipid belum maksimal, tetapi secara keseluruhan penambahan nutrisi secara bertahap bermanfaat karena jumlah produksi biomasa sel mikroalga *Nannochloropsis sp* dapat meningkat lima kali dibanding penambahan yang sekaligus dilakukan di awal masa pertumbuhan. Secara keseluruhan penambahan C, N, P secara bertahap memberi hasil produksi biomasa jauh lebih tinggi dibanding penambahan yang sekaligus di awal masa pertumbuhan.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terima kasih kepada koordinator program penelitian kompetitif lipi sub bidang energi baru dan terbarukan tahun 2009 yang membiayai penelitian. kepada ibu mimin, sdr ketut, dan sdr. agung atas bantuannya dalam pelaksanaan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Christi, Y. (2007). Biodiesel From Micro-Algae, *Biotechnol Adv* 25:294-306.
- Li, Y.M., Wu, N., Lan, C.Q., & Dubois, C.N. (2008). Biofuels from microalga, *Biotech Prog* DOI 10.1021/bp070371kS8756-7938(07)00371-2.
- Wagner, L. (2007). Biodiesel from Algae Oil, Research Report. MORA Associates.
- Huntley, M.E. & Redalje, D.G. (2007). CO₂ mitigation and renewable oil from photosynthetic microbes: a new appraisal, *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, Springer, 12: 573–608.
- Lupi, F.M., Fernandes, H.M.L., Tome, M.M., Sacorreia, I., & Novais, J.M. (1991). Influence of nitrogen source and photoperiod on exopolysaccharide synthesis by the microalga. *Enzyme microb. Technol.* 16: 546-550.
- Singh, Y. & Kumar, H.D. (1992). Lipid & hydrocarbon production by *Botryococcus*. under nitrogen limitation and anaerobiosis, *World J. Micro-Biotechnol* 8:121-124.

- Huertas, E.I., Colman, B., Espie, G.S., & Lubian, L.M. (2000). Active transport of CO₂ by three species of marine microalgae, *J Phycol* 36: 314-320.
- Xu, N., Zhang, X., Fan, X., Han, L. & Zeng, C. (2001). Effect of nitrogen source and concentration on growth rate and fatty acid composition of *Ellipsoidion sp* (Eustigmatophyta), *Journal of Applied Phycology* 13: 463-469.
- Lourenco, S.O., Barbarino, E.L., Marquez, U.M. & Aedar, E. (1998). Distribution of intracellular nitrogen in marine microalga: basis for the calculation of specific nitrogen-to-nitrogen conversion factors, *J Phycol* 34:798-811.
- Beardall, J., Johnson, A., & Raven, J.A. (1998). Environmental regulation of CO₂-concentrating mechanism in microalgae, *Can. J. Bot* 76: 1010-1017.
- Huppe, J.C. & Turpin, D.H. (1994). Integration of carbon and nitrogen metabolism in plant and algal cells, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 25: 577-607.
- Wang, B., Li, Y., Wu, N. & Lan, C. Q. (2008). CO₂ bio-mitigation using micro algae, *Applied Microbial Biotechnology* 79, 707-718.
- Liang, Y., Sarkany, N. & Cui, Y. (2009). Biomass and lipid productivity of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnol Lett* 31:1043-1049.
- Su, C.H., Fu, C.C., Chang, Y.C., Nair, G.R., Ye, J.L. Chu, I.M. & Wu, W.T. (2008) Simultaneous estimation of chlorophyll a and lipid content in microalgae by three-color analysis, *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 99 (4): 1034-1039.
- Grobbelaar, J.U. & Kurano, N. (2003). Use of photoacclimation in the design of a novel photobioreactor to achieve high yields in algal mass cultivation, *Journal of Applied Phycology* 15: 121-126.
- Bligh, E.G. & Dyer, W. J. (1959). A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol* 37: 911-917.
- Fabregas, J., Maseda, A., Dominguez, A. & Otero, A. (2004). The cell composition of *Nannochloropsis sp* change under different irradiances in semi continuous culture. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 20: 31-35.
- Hoek., C.V.D., Mann, D.G. & Jahns, H.M. (2002). *Algae: An introduction to phycology*, Cambridge University Press. 7-8: 131-133.
- Tri Astuti, J., Lies Sriwuryandari, Ekoputo Agung, Sembiring, T. (2010). Growth and fatty acid composition of microalga *Nannochloropsis* in medium enriched with magnesium, *Jurnal Teknologi Lingkungan*. Vol 11 (3): 409-416.
- Lubian, L.M., Montero, O., Garrida, I.M., Huertas, I.E., Sobrino, C., Gonzales, M. & Parés, G. (2000). *Nannochloropsis (Eustigmatophyceae) as a source of commercially valuable pigments*, *Journal of Applied Phycology* 12: 249-255.
- Giordano, M. Beardall, J. & Raven, J.A. (2005). CO₂ concentrating mechanism in algae: mechanism, environmental modulation, and evaluation. *Annual Review Plant Biology* 56:99-131.
- Hu, H. & Xu, Z. (2008). Nitrite utilization by *Chaetoceros muelleri* under elevated CO₂ concentration, *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 24 (6): 891-894.
- Hu, H. & Zhou, Q. (2010). Regulation of inorganic carbon acquisition by nitrogen and phosphorus levels in *Nannochloropsis sp*, *World J Microbial Biotechnol* 26 (5): 957-961.
- Perry, R.H. & Green, D. (1984). *Chemical Engineer's Handbook*, six edition, MGH International Ed.
- Cotton, F. A. & Wilkinson, G. (1972). *Advanced inorganic chemistry*. 3rd ed, John Wiley & Sons Ltd., London-New York.

- Ratledge, C. (2002). Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms. *Biochem Soc Trans* 30: 1047-1050.
- Tri Astuti, J., Lies Sriwuryandari, Retno Yusiasih & Sembiring, T. (2008). Growth and Lipid Content Of Micro Algae *Nannochloropsis* with Different source of Nitrogen in Natural Environment, *Teknologi Indonesia* 31 (2): 121-127.
- Fang, X., Wei C., Ling C.Z. & Fan O. (2004). Effects of organic carbon sources on cell growth and eicosapentanoic acid content of *Nannochloropsis* sp, *Journal of Applied Phycology* 16: 499-503.